

University of Groningen

## Antibodies against leucocyte common antigen (CD45). Applications in immunomodulation

Visser, Alida

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2000

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Visser, A. (2000). Antibodies against leucocyte common antigen (CD45). Applications in immunomodulation. Groningen: s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift probeert een totaal beeld te geven van een molecuul, CD45, en beschrijft de opbouw, expressie en functie van CD45 en daaraan gekoppeld het effect dat antilichamen tegen CD45 in een aantal processen hebben.

"Leukocyte Common Antigen" (CD45) is een familie van eiwitten die op alle cellen met een kern in het bloed, beenmerg en lymfoïde organen gevonden worden. Het is een glycoproteïne -een eiwit met veel suikergroepen- met een molecuul gewicht van rond de 200 kDa. Met ongeveer een miljoen van dergelijke moleculen per lymfocyt bedekt het 10% van het cel oppervlak. Er zijn 4 verschillende molecuul gewichten gevonden van 180, 190, 205 en 220 kDa en die bleken afkomstig van 6 verschillende isovormen. Allemaal zijn ze afkomstig van hetzelfde gen maar ze ontstaan door 3 verschillende coderende stukjes mRNA (exonen) variabel te gebruiken. De 3 exonen heten A, B en C en leiden tot eiwitten als ABC (220 kDa), AB, BC (205 kDa), B, C (190 kDa) en als alle 3 exonen niet gebruikt worden de isovorm O (180 kDa). Verschillende isovormen kunnen naast elkaar op dezelfde cel voorkomen.

Monoklonale antilichamen die met alle 6 isovormen reageren heten CD45. Antilichamen die met A reageren (ABC, AB) heten CD45RA, met B (ABC, AB, BC, B) CD45RB, en met C (ABC, BC, C) CD45RC. Als geen van de exonen gebruikt wordt ontstaat een uniek stukje eiwit en antilichamen die daarmee reageren heten CD45RO. Op de verschillende isovormen komen soms ook unieke suikergroepen voor. MT3, een antilichaam dat met een suikergroep aan B reageert, reageert alleen met de isovormen AB en B maar niet met ABC en BC. De suikergroep waarmee MT3 reageert is dus specifiek voor de AB en B isovormen (hoofdstuk 2).

Het intracellulaire gedeelte van CD45 bevat 2 homologe proteïne tyrosine fosfatasen (PTPases). PTPases zijn enzymen die eiwitten kunnen defosforyleren, een belangrijke stap in de activatie en inactivatie van signaaleiwitten. Het CD45 PTPase speelt een belangrijke rol in allerlei signaaltransductieprocessen, waarvan met name de T-celactivatie uitgebreid onderzocht is. Daar staat CD45 aan het begin van de cascade van processen die in werking treedt na stimulatie via het T-celreceptorcomplex. Met behulp van CD45 deficiënte cellijnen en knock-out muizen is de functie van CD45 duidelijker geworden, met name de rol van het intracellulaire PTPase. CD45 speelt in T-cellen een rol in de ontwikkeling en differentiatie en/of selectie. In knock-out muizen worden geen ontwikkelde T-cellen gevonden. Maar ook in activatie en specifieke functies als cytotoxiciteit speelt CD45 een rol, aangezien in CD45-deficiënte cellen dergelijke processen niet functioneren. B cellen zonder CD45 komen normaal tot ontwikkeling maar kunnen niet geactiveerd worden.

Een specifieke receptor of ligand voor CD45 is nog steeds niet gevonden, maar er is een hele reeks van moleculen die met CD45 geassocieerd gevonden zijn. De meeste van die moleculen associëren met CD45 door de 'plakkerigheid' van de vele suikergroepen. Interacties met moleculen tussen verschillende cellen maar ook tussen verschillende moleculen op dezelfde cel komen voor.

De verschillende isovormen en suikergroepen zorgen er voor dat we met behulp van anti-CD45 antilichamen onderscheid kunnen maken tussen cellen met verschillende functies. Op B cellen is dat vooral door de suikergroepen en op T-cellen door de isovormen.

We hebben 3 nieuwe antilichamen geproduceerd tegen CD45RB (MT3, MT4, en MT5) en vergeleken met andere bekende CD45RB reagentia. We hebben niet alleen gekeken of deze nieuwe antilichamen verschillend met verschillende groepen cellen reageren, maar ook of ze effecten op de functie van die cellen hadden.

De ontwikkeling en met name selectie van T-cellen vindt plaats in de thymus. De T-cellen in de medulla zijn CD45RA, RB en RC positief en in de cortex met name CD45RO en zwakker RB positief. T-cellen in tonsil, lymfklier en milt zijn allemaal RB positief en gedeeltelijk RA en RO. De CD45RA-cellen zijn niet CD45RO-positief en omgekeerd. De T-cellen in het kiemcentrum zijn CD45RO positief (hoofdstuk 2).

T-cellen zoals we ze in het bloed vinden zijn ook CD45RA-positief of CD45RO-positief. Het blijkt dat de CD45RA-positieve cellen de jonge, naïeve T-cellen zijn, en CD45RO-positieve de rijpe T-cellen zijn. De expressie van CD45RB is te verdelen in zwak en sterk positieve cellen. Het is gebleken dat de T-helper celpopulatie (de CD4-positieve cellen) naar aanleiding van hun functie in 3 groepen kan worden opgedeeld. We kunnen die groepen met behulp van CD45 ook onderscheiden. De Th0 populatie, onrijpe cellen die nog Th1 of Th2 kunnen worden, is CD45RA-positief en heeft een sterke CD45RB expressie. De Th1 cellen, cellen die helpen bij de afweer die door cellen geregeld wordt (de cellulaire immuun reactie), zijn CD45RO-positief en brengen CD45RB sterk tot expressie. Th2 cellen, cellen die voor de afweer met behulp van antilichamen zorgen (de humorale immuun reactie), zijn CD45RO-positief en hebben een zwakke expressie van CD45RB. Als de cellen met behulp van die CD45 expressie gesorteerd en gestimuleerd worden, gaan ze inderdaad de bijbehorende groeifactoren (cytokines) maken. De Th0 cellen hebben ongeveer alle mogelijke isovormen van CD45 op hun membraan (ABC, AB, BC en B), en de Th1 en Th2 cellen alleen de O- en B-isovormen. De Th2-populatie heeft meer O en minder B, waardoor het verschil tussen RB sterk en zwak ontstaat (hoofdstuk 4). CD8-positieve cellen (suppressor/cytotoxische cellen) zijn ook CD45RA- of RO- positief, maar eigenlijk allemaal sterk voor RB. Het blijkt dat CD45RO-positieve cellen de cytotoxische cellen zijn, terwijl de CD45RA-positieve cellen de suppressor cellen zijn. Natural killer cellen zijn CD45RA-positief (dus RO-negatief) en brengen CD45RB sterk tot expressie (hoofdstuk 3 en 4).

Door de vele suikergroepen is CD45 relatief ongevoelig voor eiwitknippende enzymen (proteasen). Alleen in het B-gedeelte hebben we een knipplaats gevonden. Door de specificiteit van het protease dat maar achter 2 verschillende aminozuren (eiwitbouwstenen) kan knippen is de knipplaats in B precies aan te wijzen. Vervolgens is dan na te gaan binnen exon B waar de verschillende antilichamen met B reageren (hoofdstuk 4).

Er was in de literatuur al bekend dat antilichamen tegen CD45 zelf ook effecten kunnen hebben op processen in de cel en tussen cellen onderling. We hebben een reeks van antilichamen getest op hun vermogen om cellijnen te kunnen doen samenklonteren (aggregatie). Verschillende RB-antilichamen (MT3, MT4, MT5) werken via verschillende mechanismen en ook dat is nog cellijn-afhankelijk. In een van de T-cellijnen (Jurkat) kunnen MT3, MT4 en MT5 cellen laten aggregeren. Met MT3 en MT5 is daar calcium voor nodig en gaat dat gepaard met de fosforylering van intracellulaire eiwitten (hoofdstuk 4).

Antilichamen tegen CD45 hebben ook een effect op T-celactivatie en dat kun je bijvoorbeeld meten door te kijken naar de expressie van specifieke

activatieeiwitten op de cel. Het is duidelijk dat het remmen dat proces de activatie van T-cellen remt. Antilichamen die met name de groeifactoren remmen (hoofdstuk 4) is door de productie van name de groeifactoren en interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) UCHL1 (CD45RO) patiënten moeten getest worden op groeifactor die ook de groei remt. Er is dus veel onderzoek naar hoe veelheden mRNA er waarschijnlijk maar relatief weinig m

Incubatie van c van sterk naar zwak v wordt door de incubat een protease kunnen de juiste plaats terech CD45RO-positief. Het Th2.

Wanneer een a de aantallen cellen in l behandeling die aant behandelde met CD45RB-ant voor de CD45RB-ant aanwezig. Aangezien v in de muizen ook het e

Op grond van d tegen CD45RB getest i de Th1-reactie te stopp veroorzaakt. In de mui rejectie voorkomen w verschillen tussen beid werkt (het aantal cellen overleving in een nier behandeling ongeveer (insuline producerende en behandeld met CD4 depletie van cellen met meer Th2-achtige reacti

In een eilandjes- muis getransplanteerd v ook verlengd worden. muizen de afstotingsr binnengedrongen, en d die met CD45RB behar gevonden. In de onbe dagen normaal, en dan



activatie en dat kun  
e van specifieke

In een eilandjes-transplantatiemodel waarbij ratteneilandjes in een suikerzieke muis getransplanteerd worden (xenotransplantatie), kan met CD45RB de overleving ook verlengd worden. Op dag 6 na transplantatie zijn dan in de onbehandelde muizen de afstotingsreacties al op gang, de T-cellen zijn het transplantaat binnengedrongen, en de cytokines IL-2, IFN- $\gamma$  en IL-10 zijn aanwezig. In de muizen die met CD45RB behandeld zijn worden op dag 6 nog geen T-cellen en cytokines gevonden. In de onbehandelde muizen zijn de bloedsuikerspiegels ongeveer 7 dagen normaal, en dan worden de muizen weer diabeet. In de behandelde muizen

duurt dat langer; de eerste muizen worden na 17 dagen diabeet en een van de muizen is al langer dan 300 dagen gezond. Een heel ander type transplantatie is de transplantatie van beenmergcellen. De grootste zorg is dan de reactie van de getransplanteerde cellen tegen het lichaam van de ontvanger (graft-versus-host reactie). In dit model kunnen we de overleving met antilichamen tegen CD45RB verbeteren van 11% zonder behandeling tot 33% met behandeling (hoofdstuk 6).

Hoe werken CD45RB-antilichamen in transplantatie? Er zijn een paar mogelijkheden: (1) door de eiwittyrosinefosfatase (PTPase), (2) door de depletie van specifieke T-cellen samen met de veranderingen van CD45RB op de celmembraan waardoor de cellen van functie veranderen, of (3) door het blokkeren van interacties tussen cellen. Onze hypothese is dat de depletie van de Th1 en cytotoxische cellen de belangrijkste factor is. Door de Th1 cellen tijdelijk te verwijderen zijn ook de Th1 cytokines IL-2 en IFN- $\gamma$  niet aanwezig en krijgen Th2 cellen een kans om bijvoorbeeld IL-4 en IL-10 te produceren. Als dat het geval is, kunnen die cytokines de Th2 reactie als het ware op gang houden; als dan de Th0 cellen terugkomen in het transplantaat worden ze 'opgevoed' om Th2 cellen te worden. Het milieu dat dan ontstaat - met name de aanwezigheid van IL-10 - is belangrijk voor het ontstaan van andere immuunreacties; bijvoorbeeld een Th3-reactie, waarvan bekend is dat die door de productie van TGF- $\beta$  betrokken is bij de inductie van orale tolerantie. Maar ook een reactie door Tr1 cellen, cellen met een regulerende werking, die heel goed betrokken kunnen zijn bij de inductie van tolerantie.

In de toekomst willen we graag CD45RB antilichamen in de kliniek gaan gebruiken. Daarvoor moeten humane of gehumaniseerde antilichamen gemaakt en getest worden. Er is tegenwoordig al een aantal gehumaniseerde antilichamen tegen andere, bij ziekte betrokken, moleculen met succes in de kliniek in gebruik.

#### Publications:

Visser, L., Groenewoud, R., 120.1987.

Visser, L., Shaw, A., Slupsky, cell leukemia. Blood 74, 321

Visser, L. and Poppema, S., like phenotypes by phorbol 359-365. 1990.

Visser, L., Dabbagh, L., and activated T cells and T-cell l

Visser, L., Lai, R., and Popp blood T cell populations. Cel

Visser, L. and Poppema, S., Leucocyte Typing VI. Kishim Okumura, Shaw, Springer, S

#### And:

Poppema, S., Visser, L., and with intrafollicular T lymphoc

Poppema, S., de Jong, B., At immunologic, enzymehistoch disease. Evidence for a B-cel

Poppema, S., Boes, A., de Le immunoenzymatic staining er 186, 767-775. 1985.

Poppema, S., Timens, W., and disease is a B cell lymphoma.

Timens, W., Visser, L., and P disease is a germinal center ly

Poppema, S. and Visser, L. P paraffin tissue reactive panel.

Poppema, S., Hollema, H., Vis MB3) reactive with leukocyte s 429. 1987.

Brinker, M.G., Poppema, S., B immunoglobulin gene rearrang 1987.

Poppema, S., Brinker, M., and proliferating cells. In: *Hodgkin's* Humphrey, Poppema, eds. Klu